

## 第19回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## 体外での雄性配偶子形成

小川 毅彦

横浜市立大学

精子形成はげっ歯類では1か月以上、ヒトでは2か月以上に亘って生じる複雑で精巧な細胞分化の過程である。精子形成を培養下で再現する試みは古くからなされてきたが未だに完成されていない。

私たちは古典的な器官培養法を用いてマウスの精子幹細胞から精子までの完全な精子形成に成功した<sup>1)</sup>。産生された精子は妊孕能もあり、顕微授精で健康な次世代の出産にも達成された。さらに精巣組織は液体窒素内に凍結保存することができ、解凍後に培養して精子形成することもできる<sup>2)</sup>。またもともと培養精巣組織内にある精子幹細胞からの精子形成のみならず、別の組織由来の精子幹細胞を移植し、それを培養することでも精子形成が可能である<sup>3)</sup>。さらに、精子形成障害を示す突然変異マウスを培養下で治療することにも成功している<sup>4)</sup>。これら実験結果は、器官培養法が精子形成研究に非常に有用であることを示しており、将来は男性不妊症の治療にも応用できると期待される。

しかしながら、これまでの成果はすべてマウス精巣を用いたものであり、他の動物種では成功例がない。またマウスにおいても尚、精子産生効率は非常に低く、生体内の効率には遥かに及ばない。培養期間も2ヵ月間程度が限度である。それらの課題を克服するためには、培養液の改良ならびに培養システム全体を新しくする必要があると考えている。培養液の改良に当たっては、現在使用している $\alpha$ MEM+AlbuMAX (40 mg/ml) では明らかになっていない精子形成誘導・促進因子を同定することが重要である。そのための試みとして化学組成の明らかな培養液を作成し、それによる培養下の精子形成誘導を行っており、徐々に成果が得られつつある。また、培養システムを一

新するために、マイクロ流体システムを導入した。マイクロ流体システムは半導体技術から派生し、マイクロメートル単位の溝を基盤内に構築することができる。その基盤にPDMSという酸素透過性に優れたシリコン樹脂を入れて固めることで、マイクロ流体デバイスが作成できる。そこに精巣組織片を入れ、培養液を流す実験を開始した。幾つかの試行錯誤を重ね、多孔膜を用いて培養液流束と培養組織片を隔てることで古典法を上回る効率でマウス精子形成を誘導することに成功した。さらにマイクロ流体デバイス内ではそれまで2ヵ月だった培養期間を6ヵ月間に延長することに成功した<sup>5)</sup>。その間に産生された精子は妊孕能をもち、顕微授精での産仔にも成功した。以上の成果は、マイクロ流体システムを用いてより効率的な培養系を造ることに成功したことを意味している。今後さらに改良を重ね、他種動物に応用できる培養液並びに培養システムの開発を目指したい。

## REFERENCES

- 1) Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T: In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504-507 (2011)
- 2) Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun.* 5: 4320. (2014)
- 3) Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun.* 2: 472 (2011)

- 4) Sato T, Yokonishi T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Matoba S, Ogonuki N, Ogura A, Yoshida S, Ogawa T. Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109 (42): 16934-16938 (2012)
- 5) Komya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Scientific Reports* Feb 19; 6: 21472 (2016)